REF 41430 ZENIT ra	**ZENIT RA CCP**	Distribuído por A.MENARINI diagnostics
INSTRUÇÕES PARA A UTILIZAÇÃO	IVD +2°C +8°C Σ 100	CE

APLICAÇÃO

O teste *ZENIT RA CCP* é um teste imunológico quimiluminescente (CLIA) para a determinação quantitativa, com instrumentação dedicada, *Analisador ZENIT RA*, dos anticorpos específicos de classe IgG dirigidos contra o péptido citrulinado cíclico (CCP) em amostras de soro ou de plasma humano (EDTA, Heparina).
Esta dosagem é utilizada como auxílio no diagnóstico de artrite reumatóide (AR).

ATENÇÃO: Qualquer decisão médica não poderá basear-se unicamente no resultado deste teste, mas deverá incluir o conjunto de todos os dados clínicos e de laboratório disponíveis.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A artrite reumatóide (AR) é uma poliartrite inflamatória crónica, progressiva com patogénese auto-imunitária a cargo das articulações sinoviais. A AR é uma das doenças auto-imunes mais comuns (1 a 2% da população europeia) e a sua evolução clínica leva, na maior parte dos casos, a uma grave disfunção da funcionalidade articular com graves formas de invalidez; portanto, o diagnóstico precoce da AR tem implicações clínicas importantes pois uma terapia aplicada nas fases iniciais da doença demonstrou-se eficaz para limitar ou reduzir a progressão das lesões e para melhorar a qualidade de vida dos doentes.
Recentemente, em combinação com o Factor Reumatóide (FR)[(1)], marcador serológico sensível, mas pouco específico, foi adicionada a pesquisa de auto-anticorpos anti-péptidos citrulinados (anti-citrulina ou CCP)[(2)], dotados de uma elevada especificidade e de um alto valor diagnóstico e prognóstico nos doentes com artrite reumatóide.
A citrulinação é um processo bioquímico que tem como objectivo as proteínas presentes na cavidade articular como resultado de eventos flogísticos. A reacção é catalisada pela enzima dependente do cálcio peptidil arginina desaminase (PAD) que desamina os resíduos de arginina da filagrina (proteína filamentosa agregada envolvida na organização do cito-esqueleto das células dos epitélios escamosos) e das outras proteínas da cavidade. Após estas modificações, os resíduos citrulinados são reconhecidos pelos anticorpos específicos[(3)].
A citrulinação das proteínas presentes na cavidade articular é um processo comum a todos os derramamentos[(4)], mas apenas os indivíduos predispostos geneticamente para sofrer de AR (HLA de classe DRB1) produzem auto-anticorpos contra os péptidos citrulinados[(5)].

Estes auto-anticorpos apresentam uma elevadíssima especificidade a AR. Os péptidos de síntese de primeira geração (CCP1) foram utilizados como revestimento nos primeiros testes ELISA demonstram bom desempenho de sensibilidade para AR (50-60 %) e de especificidade (95 a 99%)[6]. A utilização de péptidos citrulinados cíclicos de segunda geração (CCP2) melhorou consideravelmente a sensibilidade para AR (80%) mantendo uma elevada especificidade (98-99 %)[7].
Os elevados desempenhos dos testes de segunda geração para CCP estão descritos em número extremamente significativo de trabalhos científicos publicados nestes últimos anos; provavelmente a especificidade é ainda mais elevada da indicada na literatura, pois foi demonstrado que a positividade a anti-CCP manifesta-se mesmo 10 anos antes do aparecimento dos sintomas para AR[8]; consequentemente outro título de anticorpos anti-CCP num indivíduo assintomático deve ser considerado como preditivo de AR mais do que como um falso positivo.
Os anticorpos anti-CCP também demonstraram possuir um elevado valor preditivo de desenvolvimento de lesões articulares erosivas; de facto os anticorpos anti-CCP parecem ser o único parâmetro no início (incluindo também os parâmetros clínicos) capaz de indicar que o doente está evolvendo verso una forma di AR erosiva[9].
Para além disso, a sua determinação é útil para o diagnóstico de AR na infância e para distinguir a AR das colagenopatias com artrite concomitante [10].
A utilização dos anti-CCP em associação com a determinação do FR maximiza o quociente sensibilidade/especificidade. De facto, não nos devemos esquecer que 15 a 20% das AR dão resultado positivo a FR mas negativos para anti-CCP e que aproximadamente metade das AR negativas para FR dão resultado anti-CCP positivo. A positividade simultânea para FR e CCP tem um valor preditivo positivo de 100%.
No que respeita à monitorização dos doentes com AR anti-CCP positivos parece que a determinação em série destes auto-anticorpos não relacionados com o andamento clínico e a resposta aos medicamentos.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

O kit *ZENIT RA CCP* para a determinação quantitativa das IgG específicas anti-CCP utiliza um método imunológico indirecto em dois passos, baseado no princípio da quimiluminescência.
O antigénio específico é utilizado para revestir as partículas magnéticas (fase sólida) e um anticorpo anti-IgG humano é marcado com um derivado do éster de acridínio (conjugado).
Durante a primeira incubação, os anticorpos específicos presentes na amostra, nos calibradores ou nos controlos, aderem à fase sólida.
Durante a segunda incubação, o conjugado reage com os anticorpos anti-CCP capturados pela fase sólida.
Depois de cada incubação, o material não aderido à fase sólida é removido por aspiração e subsequente lavagem.
A quantidade de conjugado marcado que ficou aderido à fase sólida é avaliada através da activação da reacção de quimiluminescência e medição do sinal luminoso. O sinal criado, exprimido em unidades

relativas de luz (RLU, Relative Light Unit), é indicativo da concentração de anticorpos específicos presentes na amostra, nos calibradores e nos controlos.

AUTOMATIZAÇÃO

O *Analisador ZENIT RA* executa automaticamente todas as operações previstas pelo protocolo de dosagem: adiciona no recipiente de reacção as amostras, calibradores, controlos, partículas magnéticas, conjugado e soluções de activação da quimiluminescência; separação magnética e lavagem das partículas; medição da luz emitida.

O sistema calcula os resultados da dosagem para as amostras e para os controlos através de uma curva de calibração memorizada e imprime um relatório que inclui todas as informações relativas à dosagem e ao doente.

MATERIAIS E REAGENTES

Materiais e reagentes fornecidos

REAG	1	MP	2,5 mL

Partículas magnéticas revestidas com antigénio CCP (péptido citrulinado cíclico) em Tampão Fosfato com proteínas estabilizantes, tensioactivo, Pro-Clin 300 e azida de sódio (< 0,1%) como conservantes.

REAG	2	CONJ	25 mL

Anticorpo monoclonal de rato anti-IgG humanos, marcado com um derivado do éster de acridínio (conjugado), em Tampão Fosfato com proteínas estabilizantes e azida de sódio (< 0,1%) como conservante.

REAG	3	DIL	25 mL

Solução Diluente de Amostras: Tampão Fosfato com seroalbumina bovina, um tensioactivo, um corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO_4 como conservantes.

REAG	4	CAL A	1,6 mL

Soro humano com baixa concentração de anticorpos anti-CCP IgG em Tampão Fosfato com seroalbumina bovina, um tensioactivo, um corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO4 como conservantes.

REAG	5	CAL B	1,6 mL

Soro humano com elevada concentração de anticorpos anti-CCP IgG em Tampão Fosfato com seroalbumina bovina, um tensioactivo, um corante azul inerte, Pro-Clin 300 e Gentamicina SO4 como conservantes.

Todos os reagentes estão prontos a usar.
Os reagentes 1, 2 e 3 são embalados em conjunto constituindo um cartucho de reagentes.
As concentrações dos Calibradores são indicadas em UA/mL (Unidades Arbitrárias) e calibradas em relação a um padrão de referência interno. Os valores das concentrações, específicos para cada lote de produto, estão registados no DATA DISK incluído no kit.

DATA DISK

Mini-DVD que contém as informações relativas a todos os produtos da Linha ZENIT RA (Reagentes, Calibradores e Soros de controlo) actualizados até ao último lote de produção à excepção dos produtos expirados na data de realização do novo DATA DISK.
Basta conservar o DATA DISK com o número de lote mais elevado para manter actualizadas as informações necessárias para o funcionamento correcto do sistema.

Materiais e reagentes necessários mas não fornecidos no kit

- ZENIT RA Analyzer — Cód. Nº 41400
- ZENIT RA Cuvette Cube * — Cód. Nº 41402
  Embalagem de 960 cuvetes.
- ZENIT RA System Liquid * — Cód. Nº 41409
  1 garrafa de 0,5 litros de solução 10x.
- ZENIT RA Wash Solution * — Cód. Nº 41407
  1 garrafa de 0,5 litros de solução 20x.
- ZENIT RA Trigger Set * — Cód. Nº 41403
  1 frasco de 250 mL de Trigger A (solução de pré-activação)
  1 frasco de 250 mL de Trigger B (solução de pré-activação)
- ZENIT RA D-SORB Solution — Cód. Nº 41436
  Embalagem de 2 garrafas de 1 litro de solução pronta a usar.
- ZENIT RA Cartridge Checking System * — Cód. Nº 41401

- ZENIT RA Top Cap Set Cód. Nº 41566
  300 tampas superiores para o fecho dos recipientes dos calibradores após a primeira utilização.

(*) O analisador ZENIT RA e os acessórios identificados pelo asterisco são fabricados por Immunodiagnostic Systems S.A., Rue E. Solvay, 101, B-4000 Liège, Bélgica e distribuídos por A. Menarini Diagnostics Srl.

Outros Reagentes Aconselhados

ZENIT RA CCP CONTROL SET Cód. Nº 41451
3 ampolas de 1,5 mL de soro humano negativo e 3 ampolas de 1,5 mL de soro humano positivo para anticorpos anti-CCP.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Os reagentes fornecidos no kit ZENIT RA CCP são exclusivamente para uso em diagnóstico in vitro e não para uso in vivo em pessoas ou animais.
Este produto deve ser usado por utilizadores profissionais respeitando rigorosamente as instruções deste documento.
A Menarini não pode ser considerada responsável por perdas ou danos provocados por uma utilização diferente da indicada nas instruções fornecidas.

Precauções de segurança
Este produto contém material de origem animal e, portanto, deve ser manuseado como se contivesse agentes infecciosos.
Este produto contém componentes de origem humana. Todas as unidades de soro, ou plasma, utilizadas para o fabrico dos componentes deste Kit, foram analisadas com métodos FDA aprovados e resultaram não reactivas pela presença de HBsAg, anti-HCV, anti-HIV1 e anti-HIV2.
Todavia, como nenhum método de análise é capaz de garantir a ausência de agentes patogénicos, todo o material de origem humana deve ser considerado potencialmente infectado e manuseado como tal.
Se a embalagem estiver estragada, com derramamento dos reagentes, providenciar à descontaminação da área afectada com uma solução diluída de Hipoclorito de Sódio depois de se ter protegido com dispositivos de protecção individual adequados (bata, luvas, óculos).
Eliminar o material utilizado para a limpeza e os resíduos da embalagem afectados pelo derramamento, de acordo com as normas nacionais para a eliminação de lixos potencialmente infectados.
Alguns reagentes contêm azida de sódio como conservante. Como a azida de sódio pode reagir com o chumbo, cobre e latão revestido de chumbo, formando azidas explosivas nos canos, aconselha-se não deitar reagentes ou resíduos no esgoto mas respeitar as normas nacionais em matéria de eliminação de lixos potencialmente perigosos.

Precauções de utilização

Para assegurar a obtenção de resultados válidos devem ser rigorosamente respeitadas estas instruções de utilização e as indicações do manual de instruções do instrumento.

Os reagentes fornecidos no kit devem ser utilizados exclusivamente com o sistema *ZENIT RA Analyzer*.

Os componentes do cartucho de reagentes não podem ser retirados do cartucho e montados novamente.

Não usar o kit para além do prazo de validade.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Os reagentes fornecidos no kit estão todos prontos a usar.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Conservar os reagentes fornecidos no kit entre 2 e 8℃ em posição vertical e às escuras.

Nestas condições, o cartucho de reagente e os calibradores que não tiverem sido abertos estarão estáveis até ao fim do prazo de validade.

O cartucho de reagentes, depois de aberto, poderá ser utilizado por 60 dias, se conservado no frigorífico entre 2 e 8℃

ou a bordo da máquina.

Os calibradores, depois de abertos, poderão ser utilizados por 60 dias, se conservados no frigorífico entre 2 e 8℃ e se a permanência a bordo da máquina não ultrapassar as 6 horas por sessão.

Não congelar os reagentes e os calibradores.

PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

A dosagem deve ser executada em amostras humanas de soro e de plasma (EDTA - Heparina).

Desaconselha-se o uso de amostras lipémicas, hemolisadas e turvas.

Se a dosagem for executada mais de 8 horas depois, separar o soro, ou o plasma, do coágulo, dos glóbulos vermelhos e das provetas de separação com gel.

Antes de serem analisadas, as amostras podem ser conservadas no frigorífico entre 2 e 8℃ no máximo por 7 dias.

Se a dosagem for executada mais de 7 dias depois, conservar as amostras congeladas (< - 20℃).

Evitar congelamentos e descongelamentos repetidos.

PROCEDIMENTO

Para obter desempenhos analíticos válidos, respeitar escrupulosamente as instruções do manual de instruções do instrumento.

Carregamento dos reagentes

Os reagentes fornecidos no kit estão todos prontos a usar.

Antes de inserir o cartucho de reagentes no sistema, o recipiente das partículas magnéticas deve ser agitado por rotação horizontal de modo a facilitar a suspensão das partículas. Executar a operação evitando a formação de espuma.

Colocar o cartucho de reagentes na área dos reagentes do analisador, utilizando a respectiva guia e deixar em agitação durante pelo menos 30 minutos antes de usar.

A colocação do cartucho de reagentes determina simultaneamente a leitura do código de barras de identificação. Se o rótulo do cartucho estiver estragado, ou por falta de leitura, os dados de identificação do cartucho de reagentes podem ser introduzidos manualmente.

O analisador mantém automaticamente as partículas magnéticas em agitação contínua.

Se o cartucho de reagentes for retirado do analisador, deve ser conservado na vertical e às escuras entre 2 e 8℃.

Carregamento dos calibradores e dos controlos

Os calibradores e os controlos ZENIT RA estão prontos a usar. Deixar os calibradores e os controlos a temperatura ambiente durante 10 minutos e agitar delicadamente o conteúdo, manualmente ou com um vortex, evitando a formação de espuma. Não inverter o recipiente e não retirar a tampa perfuradora de fecho (tampa amarela para os calibradores e tampas verdes ou azuis para os controlos).

No caso em que os calibradores, ou os controlos, sejam utilizados pela primeira vez, premir a tampa perfuradora para baixo até ao fim. Deste modo, a membrana que veda o recipiente será perfurada tornando assim possível a colheita do líquido contido no mesmo. O abaixamento total da tampa perfuradora é assinalado pela simultânea cobertura da faixa vermelha situada na parte superior do rótulo (Fig. 1 – Recipiente selado e Recipiente perfurado).

Se os calibradores, ou os controlos, já tiverem sido utilizados, o recipiente terá a tampa superior (tampa branca) e a faixa vermelha do rótulo estará tapada.

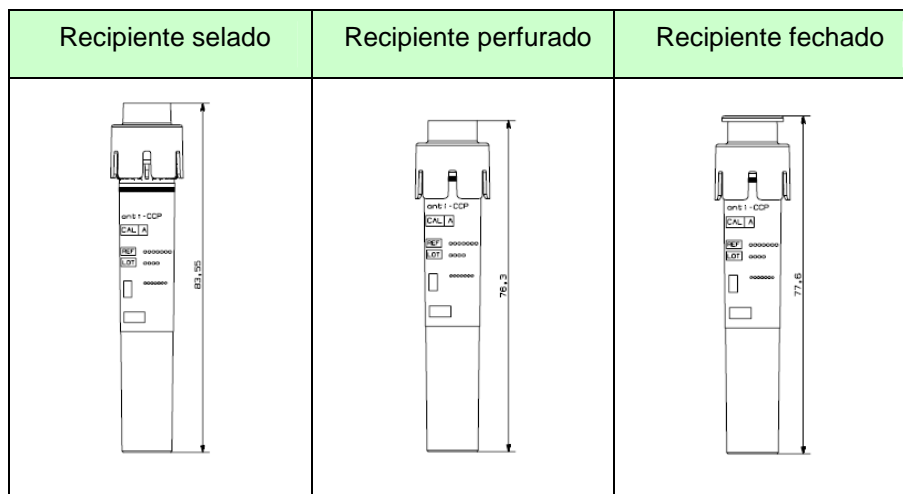
Só devem ser carregados no instrumento os recipientes sem tampa superior (tampa branca) e com a faixa vermelha do rótulo tapada (Fig. 1 – Recipiente perfurado).

Introduzir no analisador os calibradores, ou os controlos na área das amostras, depois da leitura do código de barras. Os dados do código de barras também podem ser introduzidos manualmente se o rótulo estiver estragado ou em caso de falta de leitura.

Os valores da concentração de anticorpos IgG anti-CCP presente nos calibradores, ou nos controlos, estão registados no DATA DISK e são transferidos automaticamente para o analisador. Em caso de falta de transferência dos dados, é possível introduzi-los manualmente.

No final da sessão, os recipientes dos calibradores e dos controlos devem ser fechados com as respectivas tampas superiores (tampas brancas) e conservados entre 2 e 8℃ até serem novamente utilizados (Fig. 1 – Recipiente fechado).
Os calibradores só podem ser utilizados ao máximo quatro vezes.

Figura 1: Desenho do recipiente

Recipiente selado	Recipiente perfurado	Recipiente fechado
ant1-CCP CAL A REF LOT 83,55	ant1-CCP CAL A REF LOT 76,3	ant1-CCP CAL A REF LOT 77,6

Carregamento das amostras

Identificar as amostras utilizando o leitor de código de barras e introduzi-las no analisador, no respectivo recipiente. Em caso de falta do código de barras na amostra ou em caso de falta de leitura, os dados de identificação da amostra podem ser introduzidos manualmente.
Seleccionar os parâmetros requeridos de cada amostra.

Calibração

O *Analisador ZENIT RA* utiliza uma curva de calibração memorizada (master curve), criada pelo fabricante para cada lote de cartuchos de reagentes.
Os parâmetros das “master curve”, juntamente aos valores das concentrações dos calibradores, estão memorizados no DATA DISK e são transferidos para a base de dados do analisador.
Os calibradores A e B são utilizados para recalibrar a “master curve” quer em função do analisador utilizado, quer dos reagentes a bordo.
Para executar a recalibração, analisar os dois calibradores A e B em triplicado e os controlos individualmente. Os valores de concentração obtidos com os controlos permitem validar a nova calibração.
Assim que a recalibração da “master curve” tiver sido aceitada e memorizada, todas as amostras seguintes poderão ser analisadas sem outra calibração, excepto nos seguintes casos:

- quando estiver carregado a bordo do analisador um cartucho de reagentes com um lote novo;
- quando os valores dos controlos não estiverem dentro do intervalo de aceitabilidade;
- quando for executada a operação de manutenção do analisador;
- quando tiver expirado a validade da “master curve” recalibrada.

O prazo de validade da “master curve” recalibrada para o kit *ZENIT RA CCP* é de 15 dias.
A gestão da recalibração é accionada automaticamente pelo analisador.

Dosagem

Premir o botão de início.

1. O sistema aspira 100 µL de Diluente de Amostras, 20 µL de Partículas Magnéticas, 100 µL de Diluente de Amostras e 4 µL de amostra, ou controlo (para os calibradores, o soro positivo é fornecido pré-diluído com o Diluente de Amostras e o volume recolhido é de 104 µL). As soluções e a suspensão aspiradas são distribuídas na cuvete de reacção.
2. A cuvete de reacção é incubada no rotor a 37℃ d urante 10 minutos.
3. Depois desta fase de incubação, as partículas magnéticas são separadas e lavadas.
4. São distribuídos 200 µL de conjugado na cuvete.
5. A cuvete de reacção é incubada no rotor a 37℃ d urante 10 minutos.
6. Depois desta última fase de incubação, as partículas magnéticas são separadas e lavadas e a cuvete é transferida para a câmara de leitura.
7. A quantidade de conjugado aderido à fase sólida, exprimida em RLU, é directamente proporcional à concentração de IgG anti-CCP presente na amostra.
8. As respostas obtidas são interpoladas na curva de calibração e transformadas em concentrações.

As amostras com valores de concentração mais elevados do limite superior do intervalo de medição podem ser diluídas e testadas novamente. O novo valor obtido é multiplicado pelo factor de diluição utilizado para obter o resultado final.

CONTROLO DE QUALIDADE

Para assegurar a validade da dosagem, devem ser medidos soros de controlo com níveis diferentes de concentração (pelo menos um soro negativo e um soro positivo) cada dia em que se executa a dosagem.
Se o seu laboratório requer, para a verificação dos resultados da dosagem, um uso mais frequente, ou um número mais elevado de controlos, seguir as operações de controlo de qualidade estabelecidas.
Se forem utilizados os soros de controlo ZENIT RA, os valores médios esperados e os limites de aceitabilidade são os indicados no DATA DISK também presente na embalagem dos controlos.
Se forem utilizados soros de controlo diferentes, é necessário, antes da sua utilização, definir os valores esperados com reagentes e sistema ZENIT RA.
Se o valor dos controlos não estiver dentro do intervalo de aceitabilidade especificado, os respectivos resultados da dosagem são inválidos e essas amostras devem ser analisadas novamente.
Neste caso é necessário executar uma recalibração antes da repetição da dosagem.

CÁLCULO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Cálculo dos resultados

A concentração dos anticorpos IgG anti-CCP presente nas amostras em exame é calculada automaticamente pelo sistema. Os valores podem ser visualizados no ecrã ou imprimidos.
As concentrações são exprimidas em UA/mL.
O cálculo da concentração na amostra é efectuado através da leitura da resposta obtida por cada amostra numa curva de calibração elaborada com um sistema de "fitting" logístico de quatro parâmetros (4PL, Y ponderado), corrigida periodicamente em função das respostas obtidas na dosagem dos calibradores.

Para mais informações sobre o sistema de cálculo dos resultados, consultar o manual de instruções do sistema.

Interpretação dos resultados

O intervalo de medição da dosagem *ZENIT RA CCP* é de: 0,0 a 320 UA/mL.
Os valores inferiores a 0,0 UA/mL são valores extrapolados e podem ser indicados como "iguais a 0,0 UA/mL".
Os valores superiores a 320 UA/mL podem ser indicados como "superiores a 320 UA/mL", ou testados novamente após a devida diluição.
Os resultados das amostras podem ser interpretados do seguinte modo:

(UA/mL)	Interpretação
< 5	A amostra deve ser considerada Negativa pela presença de IgG anti-CCP
≥ 5	A amostra deve ser considerada Positiva pela presença de IgG anti-CCP

Os valores acima mencionados devem ser considerados como valores indicativos. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios intervalos de referência.

LIMITES DA DOSAGEM

Para efeitos de diagnóstico, os resultados obtidos com o kit *ZENIT RA CCP* e o sistema *ZENIT RA Analyzer* devem ser utilizados em conjunto com os outros dados clínicos e de laboratório à disposição do médico.
A contaminação bacteriana das amostras e a inactivação ao calor podem influenciar o resultado da dosagem.
Os anticorpos heterófilos presentes nas amostras de soro humano podem reagir com os reagentes à base de imunoglobulinas, provocando interferências nas dosagens imunológicas in vitro. Estas amostras podem dar lugar a valores anormais, se analisados com o kit *ZENIT RA CCP*.

VALORES PREVISTOS

Foram analisadas as amostras de 100 dadores seleccionados casualmente para verificar a presença de anticorpos IgG anti-CCP.
Todas as amostras analisadas deram resultados negativos, com um valor médio de 0,25 UA/mL e um desvio padrão de 0,388 UA/mL.
Com os resultados obtidos foi calculado o "Limit of Blank" (LoB = o valor mais elevado que podemos esperar numa série de amostras que não contenham o analito). O "Limit of Blank", determinado como 95 por cento de população negativa, resultou igual a 1,2 UA/mL com o Lote de reagentes n. 1.

DESEMPENHO

Advertência: os dados apresentados não representam as especificações de funcionamento do kit, mas constituem a evidência experimental em como o kit funciona dentro dessas especificações no modo previsto pelo fabricante.

Precisão e Reprodutibilidade
A precisão e a reprodutibilidade do kit *ZENIT RA CCP* foram avaliadas utilizando um protocolo baseado nas linhas guia do documento EP5-A2 dos Clinical and Laboratory Standards (CLSI).
A ***precisão*** foi calculada analisando os resultados de 20 repetições de cinco soros (um negativo e quatro positivos com diferentes concentrações de anti-CCP IgG) executados com dois lotes de reagentes diferentes na mesma sessão experimental.
A concentração do soro anti-CCP IgG negativo (RIP1) deu um resultado compreendido no intervalo de 1,7 a 2,7 UA/mL e de 1,8 a 2,3 UA/mL respectivamente com o Lote de reagentes 1 e 2.

Na Tabela estão indicados os resultados obtidos com os 4 soros positivos.

Amostra	Reagentes Lote nº	Concentração média (UA/mL)	SD	CV %
RIP2	1	6,6	0,17	2,5
	2	6,7	0,32	4,8
RIP3	1	25,7	1,00	3,9
	2	26,4	1,09	4,1
RIP4	1	51,1	2,03	4,0
	2	52,4	2,02	3,9
RIP5	1	106,5	3,92	3,7
	2	107,6	3,20	3,0

A ***reprodutibilidade*** foi calculada analisando os resultados da determinação de cinco soros (um negativo e quatro positivos com diferentes concentrações de anti-CCP IgG) executada individualmente com dois lotes de reagentes diferentes, em 40 sessões diferentes.
A concentração do soro anti-CCP IgG negativo (RIP1) deu um resultado no intervalo de 1,4 a 2,7.
Na Tabela estão indicados os resultados obtidos com os 4 soros positivos.

Amostra	**Concentração média (UA/mL)**	**SD**	**CV %**
RIP2	7,8	0,37	4,7
RIP3	29,4	1,51	5,1
RIP4	57,9	3,24	5,6
RIP5	116,6	5,58	4,8

Linearidade das Diluições
A precisão das diluições do kit *ZENIT RA CCP* foi avaliada utilizando um protocolo baseado nas linhas guia do documento EP6-A dos Clinical and Laboratory Standards (CLSI).
Foram doseadas diluições escalares de 3 soros de concentração elevada de IgG anti-CCP, executadas com o Diluente de Amostras.
Os resultados deste estudo estão resumidos na tabela seguinte.

Amostra	**Factor de diluição**	**Concentração medida (UA/mL)**	**Concentração prevista (UA/mL)**	**Recuperação %**
1	1	251,9	-	(100)
	2	129,9	126,0	103,1
	4	65,8	63,0	104,4
	8	36,0	31,5	114,3
	16	19,8	15,7	126,1
	32	10,6	7,9	134,2
2	1	170,3	-	(100)
	2	86,8	85,2	101,9
	4	45,8	42,6	107,5
	8	22,7	21,3	106,6
	16	11,9	10,6	112,3
	32	6,4	5,3	120,8
3	1	239,2	-	(100)
	2	130,1	119,6	108,8
	4	65,3	59,8	109,2
	8	31,7	29,9	106,0
	16	15,9	15,0	106,0
	32	7,4	7,5	98,7

De qualquer modo torna-se necessário sublinhar que nem todos os soros, quando medidos em diluições diferentes, podem dar resultados lineares dentro do intervalo de medição dependendo o resultado não só da concentração mas também da afinidade dos anticorpos presentes na amostra.

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica do kit *ZENIT RA CCP IgG*, exprimida como ***limite de detecção*** *(Limit of Detection – LoD:* ou seja a menor quantidade de analito que o método é capaz de medir*)* foi determinada utilizando um protocolo baseado nas linhas guia do documento EP17-A dos Clinical and Laboratory Standards (CLSI) e a fórmula para o cálculo LoD = LoB + $C_β$ SDs (onde LoB representa o valor do "Limit of Blank", SDs o desvio padrão previsto pela distribuição da amostra a baixa concentração e $C_β$ deriva de 95 por cento da distribuição padrão de Gauss).

Foram utilizadas 4 amostras de baixa concentração de analito, determinadas uma só vez com dois Lotes de reagentes diferentes em 40 sessões diferentes.

O Limite de detecção do kit *ZENIT RA CCP* foi igual a 2,1 UA/mL.

Os valores do limite de detecção, juntamente com as considerações de carácter clínico e com os resultados de comparação com métodos de referência, contribuíram para a definição do valor de cut-off.

Especificidade Analítica: Interferências

Um estudo baseado nas linhas guia do documento EP7-A2 do CLSI demonstrou que os desempenhos da dosagem não são influenciados pela presença na amostra de substâncias potencialmente interferentes, indicadas na tabela seguinte, até à concentração experimentada.

Substâncias Potencialmente Interferentes	Concentração máxima experimentada
Bilirrubina livre	20 mg/dL
Bilirrubina conjugada	28 mg/dL
Hemoglobina	1000 mg/dL
Ácidos gordos	3000 mg/dL

Desaconselha-se o uso de amostras lipémicas, hemolisadas ou turvas.

Também foi demonstrado que a presença de Factor reumatóide (RF) até á concentração de 513 UI/mL não interfere na dosagem.

Especificidade analítica: Reacções cruzadas

Para avaliar as potenciais reacções cruzadas do antigénio, utilizado para sensibilizar as partículas magnéticas, foi conduzido um estudo com 25 amostras, todas com níveis altos de outros auto-anticorpos e negativos a anti-CCP IgG.

As amostras utilizadas estavam assim divididas: SS-A (2), SS-B (3), U1-snRNP (1), Jo-1 (2), Scl-70 (3), Cenp B (1), Histonas (2), Nucleolares (1), MPO (1), PR3 (1), $β_2$-GPI/CL IgG (2) e Gliadina/t-TG (3).

O estudo não demonstrou nenhuma reacção cruzada significativa do antigénio em fase sólida com os outros auto-anticorpos.

Efeito de saturação em doses elevadas

Alguns métodos imunológicos empregues para a determinação de amostras que contêm o analito em concentrações extremamente elevadas podem fornecer níveis aparentes de analito subestimados (Efeito hook).

O método utilizado no kit *ZENIT RA CCP*, sendo um método com duas incubações, não sofre esse efeito.

Uma amostra com concentração extremamente elevada (acima do intervalo de medição) de IgG anti-CCP confirmou a ausência de efeito "hook" até à concentração de 1511 UA/mL.

Sensibilidade e Especificidade Relativas

A presença de anticorpos anti-CCP IgG foi determinada utilizando o kit *ZENIT RA CCP* e um método de dosagem ELISA disponível no comércio em 288 amostras.

9 amostras deram lugar a resultados divergentes entre a dosagem ZENIT RA e a dosagem disponível no comércio.

A ***concordância relativa*** resultou assim igual a 96,9 % (279/288).

A ***sensibilidade relativa*** resultou igual a 95,7% (88/92).

A ***especificidade relativa*** resultou igual a 97,4 % (191/196).

BIBLIOGRAFIA

1. Wener MH. Rheumatoid Factors. Manual of Clinical Laboratory Immunology, NR Rose et al. American Society of Microbiology Press, 961-972 (2002).

2. Schellekens GA,Visser H, De Jong BA, Van de Hoogen FH,Hazens JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum 2000; 43: 155-63.

3. Baeten D, Peene I, Union A,Sebbag M,Serre G, Veys EM, et al. Specific presence of intracellular citrullinate proteins in rheumatoid arthritis synovium : relevance of to antifilaggrin antibodies. Arthritis Rheum 2001; 44: 2218-62.

4. Asaga H, Yamada M, Senshu T. Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. Biochem Biophys Res Commun 1998; 243: 641-6.

5. Verpoort KN, van Gaalen FA, van der Helm-van et al. Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2005; 52:3058-62.

6. Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E et al. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. Clin Chem 2001; 47: 1089-93.

7. Van Gaalen FA, Visser H, Huizinga TW. A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides autoantibody tests for rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2005; 64: 1510-2.

8. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2003; 48: 2741-9.

9. Visser H, le Cessie S, Vos K et al. How to diagnose rheumatoid arthritis early. A prediction model for persistent (erosive) arthritis. Arthritis Rheum 2002; 46: 357-65.

10. Jansen LMA,van der Horst-Bruinsma IE, van Shaardenburg D, van de Stadt RJ, de Koning MHMT, Dukmans BAC. Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptide differentiate rheumatoid arthritis fromm undifferentiated polyarthritis in patients with early arthritis. J Rheumatol 2002; 29(10): 2074-2076.

TECHNOGENETICS S.r.l.
Viale Casiraghi 471
20099 – Sesto San Giovanni (MI)

Distribuído por
A. Menarini Diagnosticos, Lda
Quinta da Fonte - Edifício D. Manuel I, 2°B
2770-203 Paço de Arcos
Tel. +351 210 93 00 00 - Fax +351 210 93 00 01
www.menarinidiag.pt